10.22092/spij.2020.119081

مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۴، شماره ۳، سال ۱۳۹۷

بررسی سیتوژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های چای (*Camellia sinensis*) در ایران

Cytological Evaluation of Some Tea (*Camellia sinensis*) Genotypes in Iran

ذبیح‌اله عاشوری[1]، صنم صفایی چایی‌کار[2] و کوروش فلک‌رو[3]

۱ و ۳- پژوهشگر، پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران.
۲- استادیار، پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۴

چکیده

عاشوری، ذ.، صفایی چایی‌کار، ص.، و فلک‌رو، ک. ۱۳۹۷. بررسی سیتوژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های چای (*Camellia sinensis*) در ایران. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۴: ۲۶۳- ۲۴۵.**

به‌منظور بررسی تنوع کاریوتیپی موجود در ژنوتیپ‌های چای، کاریوتیپ ۱۶ ژنوتیپ چای مورد مطالعه قرار گرفت. پارامترهای کروموزومی شامل طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، نسبت بازوی بلند به کوتاه و شاخص سانترومری در هر ژنوتیپ بررسی شدند. تجزیه واریانس داده‌ها تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها از نظر طول کروموزوم، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه نشان داد. فرمول کاریوتیپی نشان داد که کروموزوم‌های موجود در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نوع متاسانتریک و ساب‌متاسانتریک بودند. ماهواره و نواحی سازمان‌دهنده‌ی هستکی در ژنوتیپ‌های ۲۷۷ و ۵۸۱ مشاهده گردید. بجز ژنوتیپ ۲۰۲۱ که به‌صورت تریپلوئید (۴۵ = ۳x = ۲n) بوده و برای اولین بار گزارش گردید، سایر ژنوتیپ‌ها دیپلوئید (۳۰ = ۲x = ۲n) بودند. بر اساس نتایج تجزیه کاریوتیپی و دسته‌بندی کاریوتیپ‌ها به روش استیبنز، ژنوتیپ‌های ۲۷۷ و ۴۴۴ در کلاس 1B و 2B و سایر ژنوتیپ‌ها در کلاس 1A و 2A قرار گرفتند. به این ترتیب ژنوتیپ‌های ۲۷۷ و ۴۴۴ از نظر کاریوتیپی نامتقارن بودند. نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس پارامترهای مورفولوژیکی کروموزوم‌ها نشان داد که در تبیین مولفه‌ی اول، طول کل کروموزوم و طول بازوی بلند اهمیت بیشتری داشتند. از آنجا که مولفه‌ی اول به تنهایی حدود ۵۴/۸۳٪ از واریانس کل را توضیح داد، می‌توان نتیجه گرفت که بیشترین تاثیر را در تنوع داشت. تجزیه‌ی خوشه‌ای نیز ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در پنج خوشه‌ی جداگانه گروه‌بندی نمود.

واژه‌های کلیدی: چای، تقارن کاریوتیپ، عدد کروموزومی، تریپلوئید، دیپلوئید.

نگارنده مسئول: s.safaie@areeo.ac.ir تلفن: ۳-۰۱۳۴۲۴۲۴۰۰۱

مقدمه

چای با نام علمی *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze گیاهی است چند ساله و همیشه سبز از خانواده‌ی Teaceae که دارای خواص درمانی فراوانی بوده و به عنوان نوشیدنی مفرح مورد مصرف قرار می‌گیرد (Ahmadishad, 2005). آگاهی و دانش در مورد تعداد کروموزوم‌ها (سطح پلوئیدی) و نیز تغییرات درون و بین کروموزومی جهت درک تکامل گونه‌ها پس از انتخاب طبیعی، دورگ‌گیری و کاربرد آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی ضروری است (Ebrahim *et al*., 2012). شمارش تعداد کروموزوم‌ها و اندازه‌گیری ابعاد آن‌ها و تعیین تفاوت‌های احتمالی بین کروموزوم‌ها می‌تواند به عنوان ابزاری در تعیین احتمال موفقیت در انجام دورگ‌گیری بین گونه‌ای به کارگرفته شود (Ghanavati *et al.,* 2011).

اولین بررسی کروموزومی در چای (*Camellia sinensis*) وسط مورینگا و همکاران (Moringa *et al.,* 1929) انجام شد و تعداد کروموزوم‌های این گیاه ۳۰ = ۲x = ۲n گزارش گردید (Chaudhuri, 2001). نتایج حاصل از بررسی کاریوتیپی هشت واریته‌ی چای در کنیا با استفاده از نوک ساقه مریستمی و رنگ آمیزی کروموزوم‌ها با استواورسئین و گیمسا نشان داد که شش واریته دیپلوئید ۳۰ = ۲x = ۲n و دو واریته به طور طبیعی تری‌پلویید ۴۵ = ۳x = ۲n بودند و به طور کلی از نظر تکاملی هشت واریته دارای طول نسبی و وضعیت کینتوکور متقارن و نوع کروموزوم‌ها نزدیک متاسنتریک با نسبت بازوی ۱ تا ۱/۳ گزارش شده است. در این بررسی کروموزوم‌های متافازی فاقد ساختمان ثانویه و ماهواره بودند (Wachira *et al*., 1999).

شیدایی و همکاران (Sheidai *et al*., 2004) در مطالعه میوزی شش واریته‌ی چای در ایران، مطرح نمودند که واریته‌ها دیپلوئید (۳۰ = ۲x = ۲n) بوده و وجود کروموزوم‌های B به تعداد یک تا دو عدد در چهار واریته گزارش گردید. نتایج حاصل از بررسی سیتوژنتیکی سه واریته‌ی چای نشان داده است که تعداد کروموزوم‌ها ۳۰ = ۲x = ۲n و طول کروموزوم‌ها بین ۲/۱-۴/۲ میکرومتر متغییر بود و کروموزوم B در یکی از واریته‌ها گزارش گردیده است (Roy, 2006).

طبق تحقیقی که شارما و راینا (Sharma and Raina, 2006) بر روی ۳۲ کلون چای در کشور هند انجام دادند، ۳۱ کلون دیپلوئید (۳۰ = ۲x = ۲n) و یک کلون دیپلوئید به نام UPASI-3 با (۴۵ = ۳x = ۲n) بود و در چهار کلون ساختمان ثانویه به تعداد متفاوت گزارش گردید. نتایج تحقیقات رحمان و همکاران (Rahman *et al.,* 2010) روی شش واریته از دو گونه *Camellia sinensis*، *Camellia assamica* نشان داد که هر شش واریته دیپلوئید بودند. طول کل کروموزوم در واریته‌های گونه‌ی *Camellia assamica* بین

۳ تا ۱۰/۵ میکرومتر متغییر بود، در حالیکه در واریته‌های *Camellia sinensis* طول کل کروموزوم بین ۳/۹ تا ۸ میکرومتر متغییر گزارش گردید و نوع کروموزوم‌ها در کلیه‌ی واریته‌های دو گونه موصوف ساب متاسانتریک، ساب تلوسنتریک و متاسنتریک بود و کروموزوم ماهواره مشاهده نگردید.

غلامی و همکاران (Gholami *et al.,* 2013) نه ژنوتیپ چای از منابع ژنتیکی وارداتی موجود در ایران را از لحاظ کاریولوژیکی مورد مطالعه قرار دادند. کلیه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دیپلوئید (۳۰ = ۲x = ۲n) و دارای دو نوع کروموزوم متاسنتریک و ساب‌متاسنتریک با فراوانی متفاوت بودند. عاشوری و همکاران (Ashoori *et al.,* 2016) در بررسی سیتوژنتیکی هفت ژنوتیپ انتخابی چای گزارش نمودند که کلیه ژنوتیپ‌ها دیپلوئید (۳۰ = ۲x = ۲n) و در آنها کروموزوم B و ماهواره مشاهده نگردید و فرمول کاریوتیپی سه ژنوتیپ از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشابه و به صورت (۱۲m+۳sm) بود.

با توجه به این که مطالعات کاریولوژیکی اندکی بر روی ژنوتیپ‌های چای موجود در ایران که به عنوان منابع ژنتیکی برای برنامه‌های به‌نژادی چای محسوب می‌شوند، صورت گرفته است و اطلاعات ژنتیکی زیادی از نظر ساختار کروموزومی (سطح پلوئیدی، تعدادکروموزوم، اندازه و ابعادکروموزوم‌ها، فرمول کاریوتیپی وضعیت جایگاه تکاملی) وجود ندارد، در این تحقیق با استفاده از شمارش و اندازه‌گیری کروموزوم‌های مرحله متافازی تعدادی از ژنوتیپ‌های موجود در ایستگاه‌های تحقیقاتی چای لاهیجان، فرمول کاریوتیپی ژنوتیپ‌ها تعیین گردید و سپس با استفاده از روش‌های آماری چند متغیره، میزان فاصله ژنتیکی آنها برای بهره‌برداری در برنامه‌های دورگ‌گیری تعیین شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش برای انجام مطالعات کاریولوژیکی ۱۶ ژنوتیپ موجود در ایستگاه‌های تحقیقاتی چای لاهیجان استفاده شد (جدول ۱). مریستم انتهایی ساقه (غنچه) به کمک روش اسکواش (Agayev,1998)، با کمی تغییرات، مورد استفاده قرار گرفت. پس از جداسازی نورسته‌ترین جوانه موجود در غنچه انتهایی، نمونه‌ها در محلول پیش تیمار آلفا برومونفتالین اشباع به مدت هشت ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند.

برای تثبیت تقسیم سلولی نیز پس از خارج کردن نمونه‌ها از محلول پیش تیمار، نمونه‌ها کمی خشک شده و سپس به‌منظور حفظ ساختمان سلولی و نیز تثبیت مراحل تقسیم سلولی به‌طور همزمان و با شرایط یکنواخت محیطی در محلول کارنوی یک (اسید استیک خالص + اتانول، با نسب ۳:۱) در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد حداقل به‌مدت

جدول ۱-اسامی ژنوتیپ‌های انتخابی برای مطالعه سیتوژنتیکی و وضعیت به‌نژادی آن‌ها
Table 1. Names of selected genotypes for cytogenetic study and their breeding status

شماره ژنوتیپ Genotypes No.	کد ژنوتیپ Genotype code	منشا Origin	وضعیت به‌نژادی Breeding status
1	100	Iran	Evaluated at tea research station, Khalsar, Langerood
2	468	Iran	Being evaluated in tea research station, Fajr, Lahijan
3	399	Iran	Being evaluated in tea research station, Feshalam Fouman
4	277	Iran	Being evaluated in tea research station, Feshalam Fouman
5	581	Iran	Evaluated at tea research station,Fajr Lahijan
6	578	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan
7	2021	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan
8	416	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan
9	591	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan
10	440	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan
11	444	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan
12	703	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan
13	2013	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan
14	2023	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan
15	791	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan
16	548	Iran	Evaluated at tea research station, Fajr Lahijan

۲۴ ساعت قرار داده شدند.

در ادامه و پس از خروج نمونه‌ها از شرایط تثبیت، ابتدا آنها را در آب جاری شستشو (سه ساعت) و سپس در الکل اتانول ۷۰ درصد نگهداری شدند تا به تدریج مورد مطالعه قرار گیرند. به‌منظور هیدرولیز نمونه‌ها از اسید کلریدریک یک نرمال به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده گردید.

برای رنگ‌آمیزی، کروموزم‌ها در محلول رنگی استواورسئین ۱/۵ درصد در دمای اتاق به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری خصوصیات مورفولوژیک کروموزوم‌ها در سه سلول متافازی (سه تکرار) از نرم‌افزار Micromeasure ver3.3 استفاده گردید.

خصوصیات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده بر روی کروموزوم‌ها عبارت بودند از، طول کل کروموزم، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، نسبت طول بازوی بلند به کوتاه و شاخص سانترومری. پس از اندازه‌گیری خصوصیات مختلف کروموزومی در سه سلول، نسبت به همولوگ‌یابی کروموزوم‌ها اقدام و داده‌های حاصل بر حسب ژنوتیپ و عدد پایه کروموزومی (x = ۱۵) مرتب شدند.

برای تعیین نوع کروموزوم در ژنوتیپ‌های مطالعه شده چای از روش لوان و همکاران (Levan *et al*., 1964) استفاده گردید. سپس تعدادی از آماره‌های لازم برای سنجش تقارن کاریوتیپی نظیر درصد شکل کلی (Total Form Percentage = TF%)، اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (Difference Relative Length = DRL)، طول یک سری کروموزومی بر حسب میکرون (Total Length = TL)، طول نسبی کوتاه‌ترین

کروموزوم (Short = S%) و نسبت طول بلندترین کروموزوم به کوتاه‌ترین کروموزوم (L/S)، نامتقارنی درون کروموزومی (Assymetric = A_1) و نامتقارنی بین کروموزومی (A_2) نیز محاسبه شد. برای تعیین وضعیت تکاملی و مطالعه تقارن کاریوتیپی ژنوتیپ‌ها از جدول دوطرفه‌ی استبینز (Stebbins, 1971) استفاده شد.

داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی (طرح آشیانه‌ای) با سه تکرار تجزیه واریانس گردیدند. مقایسه میانگین ویژگی‌های کروموزومی ژنوتیپ‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. به‌منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از تجزیه به مولفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.1 و همچنین تجزیه کلاستر با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 18، به روش وارد و معیار فاصله اقلیدوسی با استاندارد Z-scores استفاده شد. تجزیه‌ی آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS ver. 18 انجام گردید.

نتایج و بحث

در بررسی کاریوتیپی به عمل آمده مشاهده شد که ژنوتیپ ۲۰۲۱ تریپلوئید و دارای ۴۵ = ۳x = ۲n کروموزوم می‌باشد، سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی دیپلوئید و دارای ۳۰ = ۲x = ۲n کروموزوم بودند (شکل ۱ و ۲). در میان ژنوتیپ‌ها، ژنوتیپ‌های ۲۷۷ و ۵۸۱ دارای کروموزوم‌های ماهواره‌دار بودند. مطالعه‌ی شیدائی و همکاران (Sheidai *et al.*, 2004) بر روی خصوصیات کروموزوم‌های میوزی شش رقم چای در ایران نشان داد که همگی دیپلوئید و تعداد کروموزوم پایه در آن‌ها ۱۵ = x بود. روی (Roy, 2006) با بررسی سیتوژنتیکی سه رقم چای گزارش نمود که هر سه رقم چای دیپلوئید بوده و تعداد کروموزوم‌های آنها ۳۰ = ۲x = =۲n بود.

در بررسی صورت گرفته بر روی ۳۲ کلون چای در هند گزارش گردید که ۳۱ کلون دیپلوئید با تعداد کروموزوم ۳۰ = ۲x = ۲n و یک کلون با نام UPASI-3 به عنوان کلون تریپلوئید با تعداد کروموزوم ۴۵ = ۳x = =۲n بود (Shrama and Raina, 2006). طبق مطالعه‌ی صورت گرفته توسط غلامی و همکاران (Gholami *et al.*, 2013)، گزارش شده است که کلیه ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی دیپلوئید و دارای ۳۰ عدد کروموزوم و متاسانتریک و ساب‌متاسانتریک با فراوانی‌های متفاوت بودند و کروموزوم ماهواره‌دار مشاهده نشد.

تجزیه واریانس داده‌های نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها از نظر طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۲). وجود تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها حاکی از وجود تنوع ژنتیکی میان آنها است. از آنجا که تنوع ژنتیکی به‌عنوان اصلی‌ترین ابزار کار به‌نژادگران

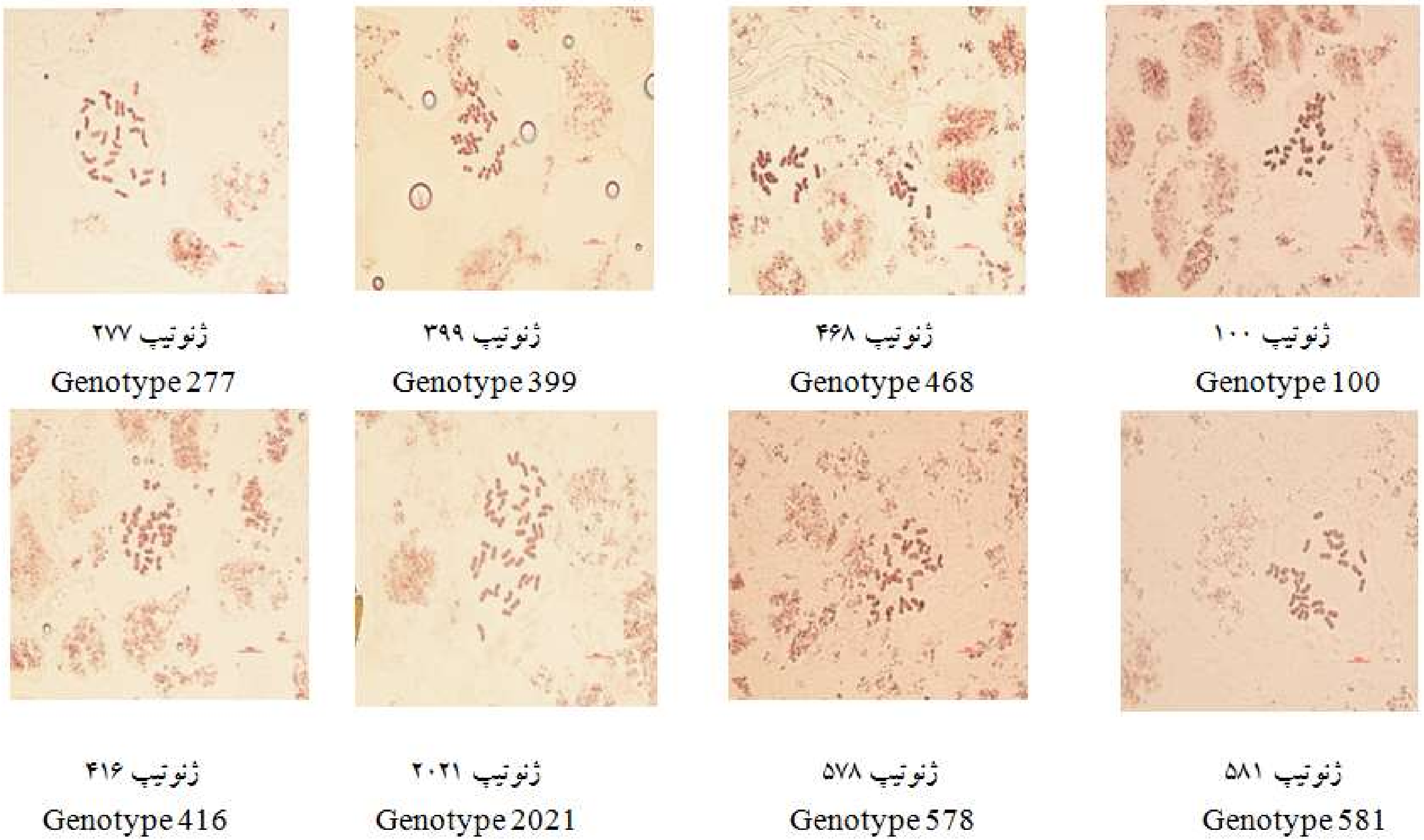
جدول ۲- تجزیه واریانس برای ویژگی‌های کروموزومی ژنوتیپ‌های چای

Table 2. Analysis of variance for chromosomal characteristics of tea genotypes

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی df.	Mean squares میانگین مربعات طول کل کروموزوم Total length of chromosome	طول بازوی بلند Long arm length	طول بازوی کوتاه Short arm length	نسبت بازوی بلند به کوتاه Long arm short arm ra
Genotype	ژنوتیپ	15	2.40**	0.85**	0.41**	0.07ns
Chromosome / genotype	کروموزوم/ژنوتیپ	224	0.47**	0.18**	0.08**	0.07ns
Error	خطا	480	0.05	0.03	0.01	0.06
C.V. (%)	درصد ضریب تغییرات	-	9.70	12.58	13.56	18.54

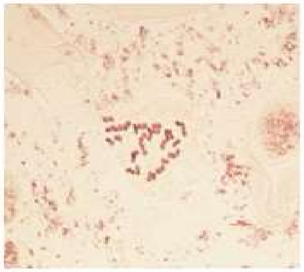
طح احتمال پنج و یک درصد.

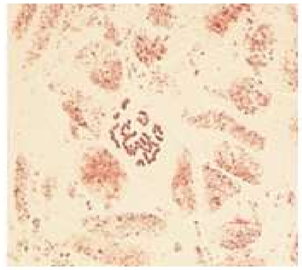
* and** : Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.
ns: Not- significant.

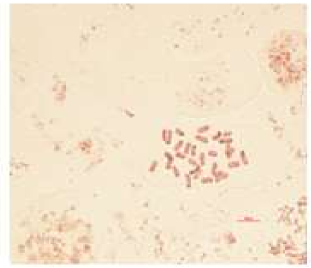


شکل ۱-گستره‌های متافازی ۱۶ ژنوتیپ چایی

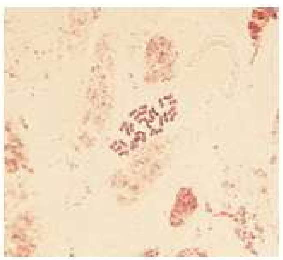
Fig. 1. Metaphase chromosome spreading for 16 tea genotypes

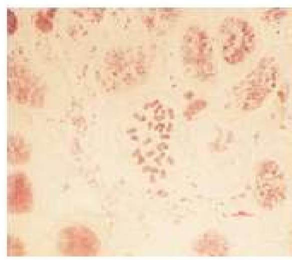

ژنوتیپ ۷۰۳
Genotype 703

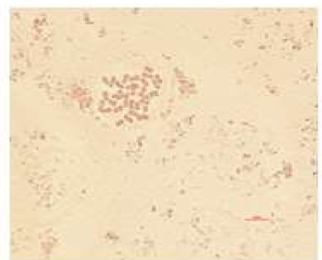

ژنوتیپ ۴۴۴
Genotype 444

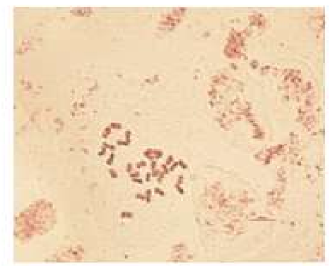

ژنوتیپ ۴۴۰
Genotype 440


ژنوتیپ ۵۹۱
Genotype 591


ژنوتیپ ۵۴۸
Genotype 548

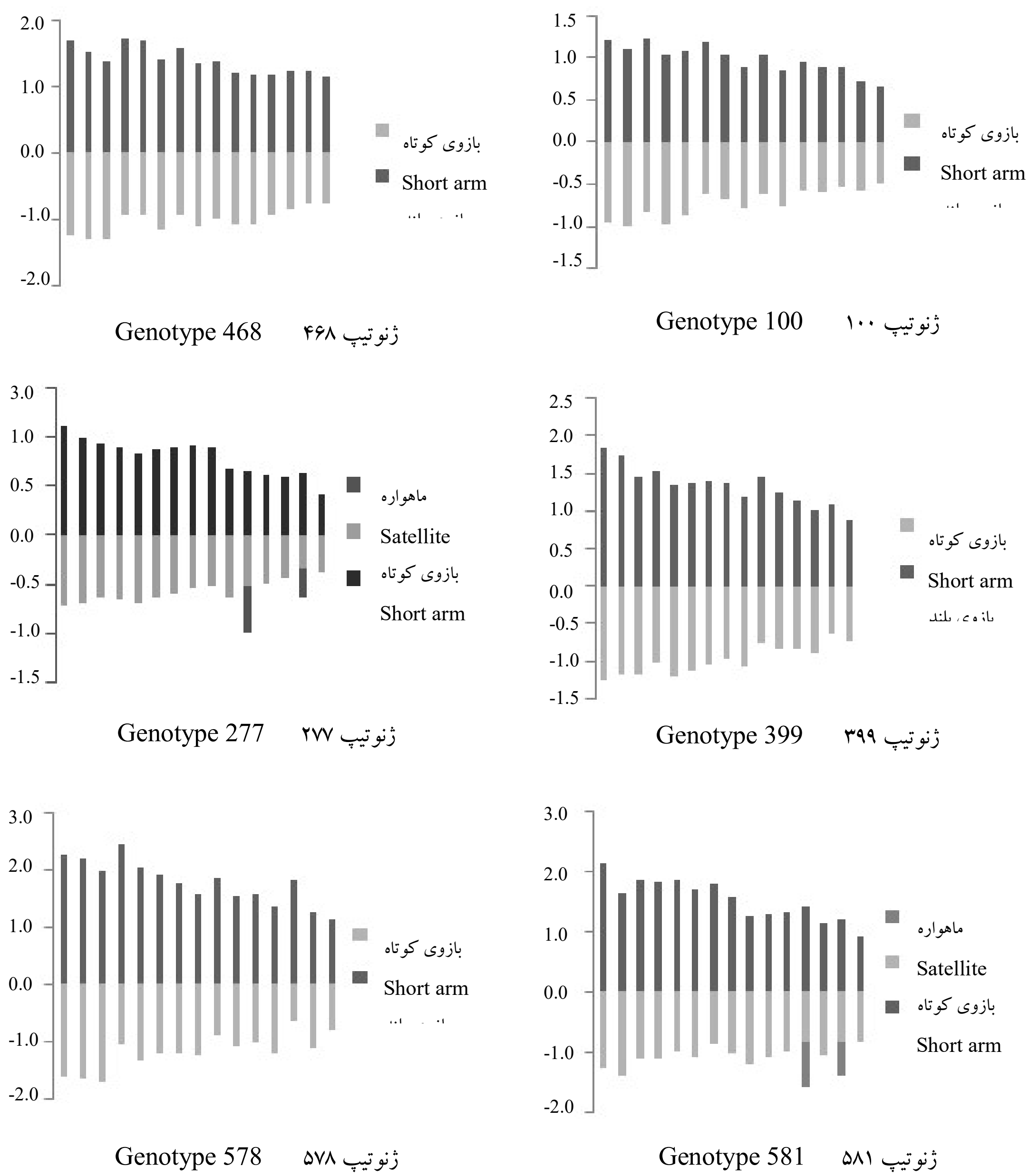

ژنوتیپ ۷۹۱
Genotype 791


ژنوتیپ ۲۰۲۳
Genotype 2023


ژنوتیپ ۲۰۱۳
Genotype 2013

ادامه شکل ۱-

Fig. 1. Continued



شکل ۲– آیدیوگرام کروموزوم‌های متافازی ۱۶ ژنوتیپ چای

Fig. 2. Ideogram of metaphase choromosomes of 16 tea genotypes

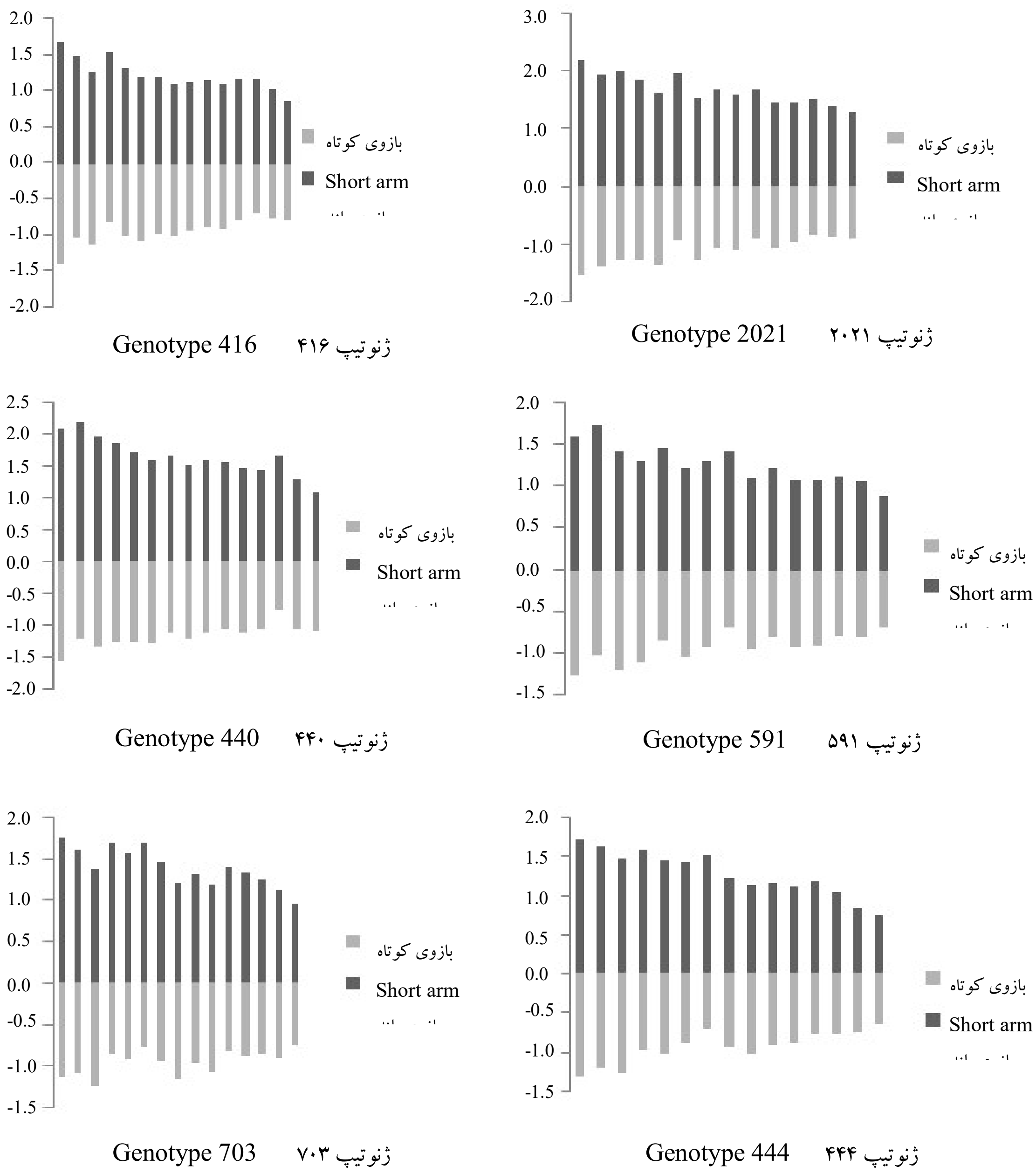


Fig. 1. Continued ادامه شکل ۱-

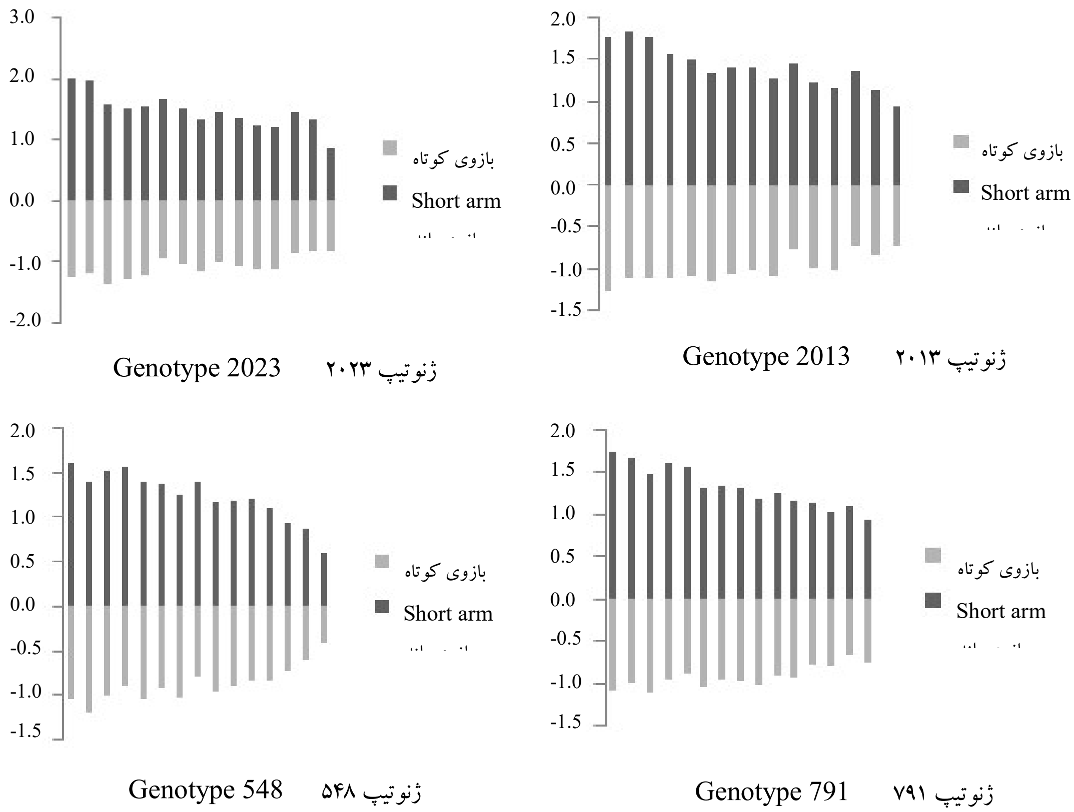


Fig. 1. Continued ادامه شکل ۱-

گیاهی محسوب می‌شود و مطالعه‌ی کاریوتیپ و خصوصیات مورفولوژیک کروموزوم‌ها نیز راهی برای مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی است (Gholami *et al*., 2013).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که، ژنوتیپ ۵۷۸ بیشترین میانگین از نظر سه صفت طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه را به خود اختصاص داد (جدول ۳). کمترین میانگین از نظر سه صفت مذکور متعلق به ژنوتیپ ۱۰۰ بود. بیشترین نسبت بازوی بلند به کوتاه مربوط به ژنوتیپ ۷۰۳ و بیشترین شاخص سانترومری متعلق به ژنوتیپ ۴۱۶ بود.

با استفاده از نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه کروموزوم‌ها و بر اساس نظر لوان و همکاران (Levan *et al*., 1964) فرمول کاریوتیپی ژنوتیپ‌های مورد بررسی تعیین گردید. ویژگی‌های کاریوتیپی ژنوتیپ‌ها در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد که نوع کروموزوم‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر از نوع متاسانتریک (m) تا ساب‌متاسانتریک (SM) می‌باشند که با نتایج سایر محققان (Ashori *et al*., 2016;

جدول۳- مقایسه میانگین ویژگی‌های کروموزومی برای ژنوتیپ‌های چای
Table 3. Mean comparison of chromosomal characteristics for tea genotypes

ژنوتیپ Genotype	صفات Characterstics طول کل کروموزوم Total length of chromosome	طول بازوی بلند Long arm length	طول بازوی کوتاه Short arm length	نسبت بازوی بلند به کوتاه Long arm: short arm ratio	شاخص سانترومری Centrometric index
100	1.82f	1.07e	0.75f	1.45ab	0.412ab
468	2.34b-e	1.37b-d	0.97b-e	1.43ab	0.416ab
399	2.58a-c	1.49a-c	1.09ab	1.39ab	0.423ab
277	2.68ab	1.56ab	1.11a	1.41ab	0.419ab
581	2.48a-e	1.46a-d	1.01a-e	1.45ab	0.411ab
578	2.76a	1.63a	1.12a	1.48ab	0.409ab
2021	2.52a-d	1.48a-c	1.03a-d	1.44ab	0.411ab
416	2.21de	1.26de	0.95c-e	1.35b	0.429a
591	2.25c-e	1.32cd	0.92c-e	1.45ab	0.413ab
440	2.44a-e	1.40b-d	1.04a-d	1.37ab	0.425ab
444	2.24de	1.29cd	0.94c-e	1.37ab	0.424ab
703	2.41b-e	1.43a-d	0.97b-e	1.49a	0.404b
2013	2.50a-d	1.44a-d	1.05a-c	1.39ab	0.422ab
2023	2.49a-d	1.44a-d	1.05a-d	1.39ab	0.421ab
791	2.18de	1.27cd	0.91de	1.40ab	0.419ab
548	2.15e	1.25de	0.89e	1.41ab	0.417ab

میانگین‌های، در هر ستون، دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means, in each column, followed by similar letter are not significantly different at the 5% probability level- using Duncan`s Multiple Rang Test.

Gholami *et al*., 2013; Rahman *et al*., 2010; Sharma and Raina, 2006; Sheidai *et al*., 2004) هم‌خوانی داشت.

ژنوتیپ‌های ۱۰۰، ۴۶۸، ۳۹۹، ۵۷۸، ۲۰۲۱، ۴۱۶، ۵۹۱، ۴۴۰، ۷۰۳ و ۲۰۱۳ از نظر درجه‌ی تقارن استبینز (Stebbines, 1971) در رتبه 2A، ژنوتیپ‌های ۵۸۱، ۲۰۲۳، ۷۹۱ و ۵۴۸ در رتبه 1A، ژنوتیپ ۲۷۷ در رتبه 2B و ژنوتیپ ۴۴۴ در رتبه 1B قرار گرفتند (جدول ۴). با توجه به اینکه اغلب ژنوتیپ‌ها در رتبه 1A و 2A قرار گرفتند، می‌توان نتیجه گرفت که تقارن کاریوتیپ چای در ایران از نظر تکاملی در مرحله ابتدایی است و به گونه وحشی نزدیک است و تنها دو ژنوتیپ ۲۷۷ و ۴۴۴ از جایگاه تکاملی پیشرفته‌تری دارند.

کاریوتیپ‌هایی که غالبا دارای کروموزوم‌های نوع متاسانتریک و ساب‌متاسانتریک هستند و اندازه نسبتاً یکسانی دارند به‌عنوان کاریوتیپ‌های اولیه محسوب شده و متقارن هستند و در طی تکامل در ساختمان کروموزوم‌های آن تغییر و نوآرایی‌های قابل توجهی در آنها رخ نداده است

جدول ۴- ویژگی‌های کاریوتیپی و پارامترهای سنجش تقارن در ژنوتیپ‌های چای

Table 4. Karyotype features and symmetry measurement parameters in tea genotypes

ژنوتیپ Genotype	درصد شکل کلی TF (%)	دامنه طول نسبی DRL (%)	طول یکسری کروموزوم (میکرومتر) TL (µm)	نسبت طول بلندترین کروموزوم به کوتاه‌ترین L : S	درصد طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم S (%)	تعداد کروموزوم 2n	سطح پلوئیدی LP	کلاس تقارن استبیز SCC	نامتقارنی درون کروموزومی A_1	نامتقارنی بین کروموزومی A_2	ماهواره sat	فرمول کاریوتیپی FK
100	41.20	3.39	27.44	1.70	59	30	2X	2A	0.29	0.11	-	12m+3sm
468	41.70	3.91	35.24	1.90	52	30	2X	2A	0.28	0.15	-	13m+2sm
399	42.29	4.08	38.74	1.92	52	30	2X	2A	0.26	0.16	-	13m+2sm
277	41.71	4.65	40.27	2.06	49	30	2X	2B	0.27	0.17	2	$11m+1m^{sat}+2sm+1sm^{sat}$
581	41.00	3.90	37.24	1.84	54	30	2X	1A	0.27	0.19	2	$11m+1m^{sat}+2sm+1sm^{sat}$
578	40.70	4.07	41.44	1.89	53	30	2X	2A	0.29	0.40	-	12m+3sm
2021	41.08	4.23	37.92	1.93	52	45	3X	2A	0.30	0.47	-	12m+3sm
416	42.96	4.35	33.19	1.95	51	30	2X	2A	0.24	0.36	-	13m+2sm
591	41.20	3.70	33.75	1.77	56	30	2X	2A	0.29	0.34	-	12m+3sm
440	42.52	3.93	36.73	1.80	57	30	2X	2A	0.25	0.25	-	13m+2sm
444	42.40	4.36	34.26	2.04	49	30	2X	1B	0.25	0.41	-	14m+1sm
703	40.39	3.78	36.16	1.80	55	30	2X	2A	0.31	0.35	-	11m+4sm
2013	42.10	3.91	37.54	1.86	54	30	2X	2A	0.26	0.38	-	13m+2sm
2023	42.06	3.80	37.47	1.80	55	30	2X	1A	0.26	0.36	-	13m+2sm
791	41.64	3.75	32.84	1.79	56	30	2X	1A	0.27	0.36	-	14m+1sm
548	41.65	3.94	32.28	1.95	51	30	2X	1A	0.28	0.34	-	13m+2sm

TF= Total form; DRL= Range of relative length; TL= Total length of chromosome; L:S= Length of longest to shortest chromosome; S= Percentage of relative length of shortest chromosome; 2n= Chromosome number; PL= Ploidy level; SSC= Srebbins symetry class; A_1= Intrachromosomal asymmetry; A_2= Interchromosomal asymmetry; Sat= Satellite; KF= Karyotype formula

(Stebbins, 1971; Paszko, 2006). از طرف دیگر افزایش نامتقارنی کروموزومی می‌تواند یا از طریق تغییر جایگاه سانترومر از ناحیه میانی یا نزدیک به میانی به جایگاه‌های انتهایی یا نزدیک به انتها رخ دهد و یا اینکه از طریق افزایش تفاوت در اندازه نسبی بین کروموزوم‌ها حاصل شود (Stebbins, 1971).

ارزیابی تقارن کاریوتیپی ژنوتیپ‌های چای در این بررسی نیز با هدف تشخیص جایگاه تکاملی آن‌ها انجام شد. چنین به نظر می‌رسد که کاریوتیپ متقارن در مقایسه با کاریوتیپ نامتقارن، جایگاه تکاملی ابتدایی‌تری دارد. این نتیجه با مطالعه‌ی گونه‌های ابتدایی و پیشرفته در یک جنس نیز به‌دست آمده است (Sheidai, 2001). بررسی خصوصیات کاریولوژیکی چای در کنیا نشان داد که کاریوتیپ این گیاه تا حد زیادی از تغییر محفوظ مانده است، به‌طوری‌که پایداری مورفولوژی کروموزوم‌های چای در کنیا و نواحی دیگر مشخص کننده‌ی اوج تکامل در آن‌ها است و می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که فرم‌های موجود، بازماندگان یک انتخاب طبیعی طولانی هستند (Wachira *et al*., 1999).

دامنه طول نسبی، تفاوت بیشترین و کمترین طول نسبی را در یک کاریوتیپ نشان می‌دهد و به عنوان پارامتری برای تعیین میزان تقارن استفاده می‌شود. به این ترتیب، ژنوتیپ‌هایی که کمترین دامنه طول نسبی را دارند دارای تقارن کاریوتیپی خواهند بود. کاریوتیپ‌های نامتقارن شاخص درصد شکل کلی (TF%) کمتری داشته و نسبت بازوی کروموزومی آنها بیشتر از دو می‌باشد. به عبارت دیگر هر چه TF% به ۵۰٪ نزدیک‌تر باشد درجه تقارن کاریوتیپی افزایش خواهد یافت (Zuo and Yuan, 2001). از طرفی با استفاده از شاخص‌های عدم تقارن (Romero, 1986) می‌توان بین ژنوتیپ‌هایی که از لحاظ کلاس تقارن استبینز در یک گروه قرار گرفتند، نامتقارن‌ترین جمعیت را شناسایی کرد.

شاخص نامتقارنی درون کروموزومی (A_1) تفاوت نسبت بازوی هر جفت کروموزوم هومولوگ را نشان می‌دهد در حالیکه شاخص نامتقارنی بین کروموزومی (A_2) با ضریب پراکندگی پیرسون مطابق بوده و نامتقارنی حاصل از آن تفاوت طول کروموزوم‌ها را نشان می‌دهد. بنابراین روند تغییرات دو شاخص TF% و A_1 (به‌عنوان شاخص‌های عدم تقارن درون کروموزومی) نشان داد که از لحاظ این دو پارامتر ژنوتیپ ۷۰۳ با فرمول کاریوتیپی 11m+4sm به‌عنوان کاریوتیپ نامتقارن و ژنوتیپ ۴۱۶ با فرمول کاریوتیپی 13m+2sm به‌عنوان کاریوتیپ متقارن تعیین شدند

از لحاظ شاخص‌های دامنه طول نسبی و A_2 (به‌عنوان شاخص‌های عدم تقارن بین کروموزومی) ژنوتیپ ۲۰۲۱ نامتقارن‌ترین و ژنوتیپ ۱۰۰ متقارن‌ترین کاریوتیپ شناسایی شد. از لحاظ شاخص طول نسبی کوتاه‌ترین

کروموزوم (S%) بیشترین مربوط به ژنوتیپ ۱۰۰ و کمترین آن مربوط به ژنوتیپ‌های ۲۷۷ و ۴۴۴ بود (جدول ۴).

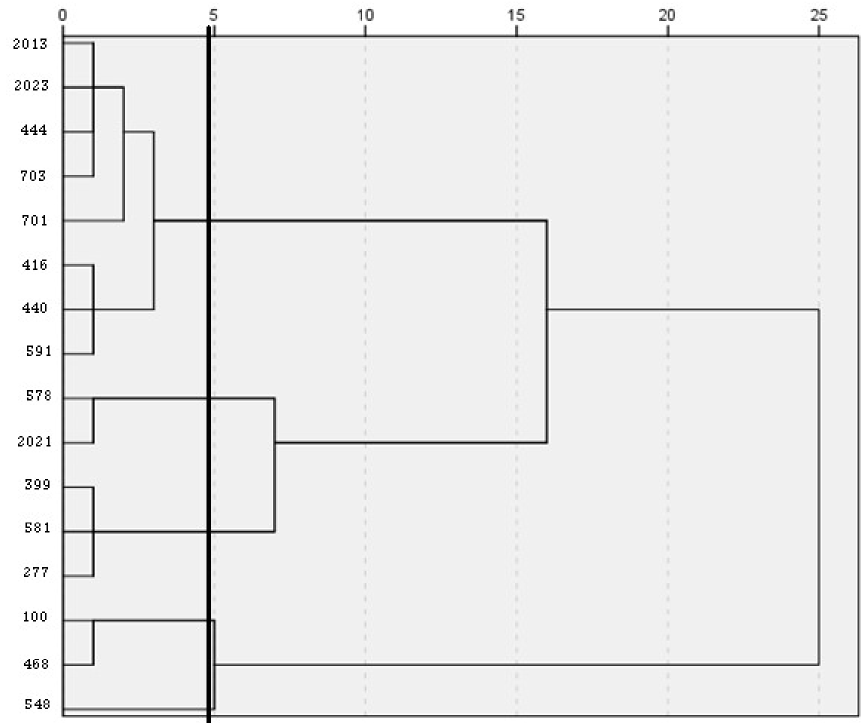
لازم به ذکر است که با توجه به این‌که برای محاسبه هر یک از آماره‌های سنجش تقارن کاریوتیپی از یک ویژگی خاص کروموزوم‌ها استفاده می‌شود، لزوما نباید نتایج حاصل از آن‌ها کاملاً مشابه یکدیگر باشد (Mirzaie Nodoushan *et al.*, 1999).

در تجزیه به مولفه‌های اصلی، برای تعیین سهم هر یک از ویژگی‌های کاریوتیپی در تنوع بین ژنوتیپ‌ها، دو مولفه اصلی اول و دوم در مجموع ۹۹/۵۹ درصد از تنوع موجود بین ژنوتیپ‌ها را توضیح دادند. ضرایب بردارهای ویژه در مولفه اول نشان داد که طول کل کروموزوم و طول بازوی بلند بیشترین نقش را در ایجاد تنوع بین ژنوتیپ‌ها داشتند. در مولفه دوم نیز طول بازوی کوتاه، نسبت بازوی بلند به کوتاه و شاخص سانترومری با داشتن بالاترین ضرایب بردار ویژه دارای بیشترین اهمیت در تغییرات بین ژنوتیپ‌ها بودند (جدول ۵).

جدول۵- مقدار ویژه، درصد واریانس و ضرایب بردارهای ویژه در مولفه اول و دوم
Table 5. Eign value, percentage of variance and coefficient of eign value in the first and second components

		ضرایب بردارهای ویژه Coefficient of eign values	
Characteristic	خصوصیت	مولفه اول First component	مولفه دوم Second component
Total length of chromosome	طول کل کروموزوم	0.57	0.18
Long arm length	طول بازوی بلند	0.60	-0.02
Short arm length	طول بازوی کوتاه	0.43	0.46
Long arm to short arm ratio	نسبت بازوی بلند به کوتاه	0.23	-0.61
Centromeric index	شاخص سانترومری	-0.24	0.61
Eign value	مقادیر ویژه	2.74	2.23
Percentage of variance	درصد واریانس	54.83	44.76
Cumulative variance percentage	درصد واریانس تجمعی	54.83	99.59

تجزیه کلاستر با استفاده از ویژگی‌های کاریولوژیک به روش حداقل واریانس وارد (Ward) انجام گردید و بر اساس آن ژنوتیپ‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند (شکل ۳). بر این اساس ژنوتیپ‌های ۲۰۱۳، ۲۰۲۳، ۴۴۴، ۷۰۳، ۷۰۱، ۴۱۶، ۴۴۰ و ۵۹۱ در گروه یک واقع شدند. ژنوتیپ‌های ۵۷۸، ۲۰۲۱ در گروه دوم قرار گرفتند که این ژنوتیپ‌ها از لحاظ طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه به دلیل داشتن میانگین بالاتر از سایر ژنوتیپ‌ها جدا شدند. ژنوتیپ‌های ۳۹۹، ۵۸۱ و ۲۷۷ در گروه سوم و ژنوتیپ‌های ۱۰۰، ۴۶۸ در



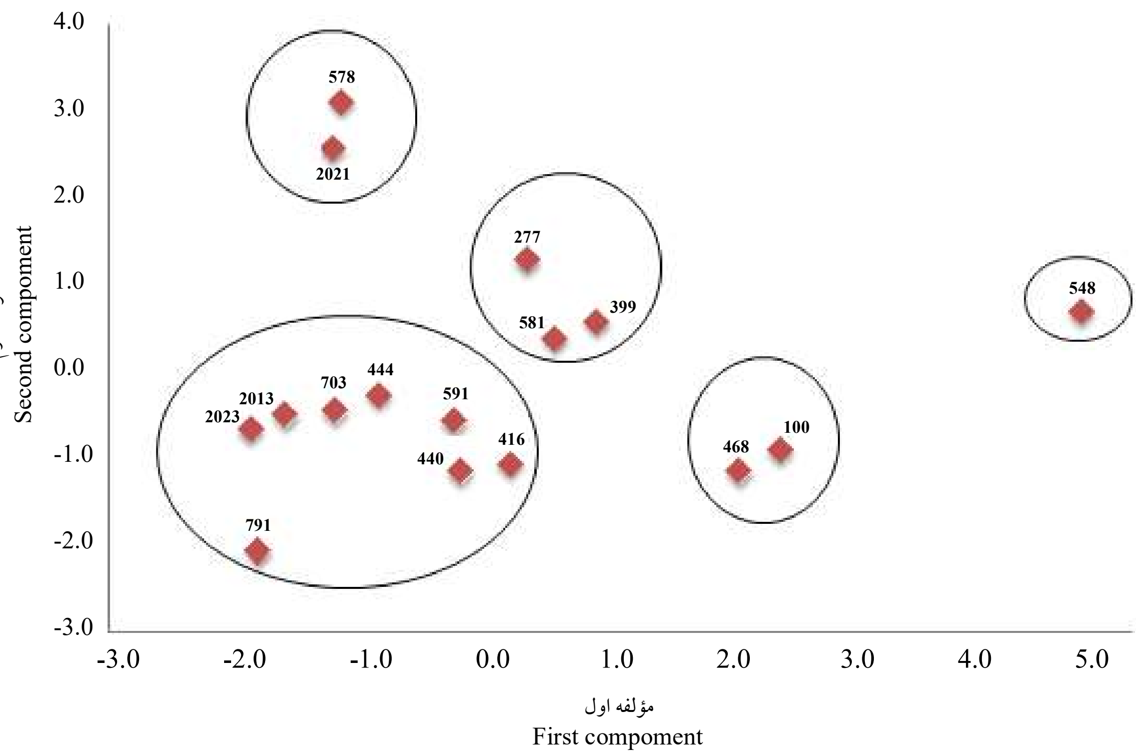
شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش حداقل واریانس وارد برای ویژگی‌های کاریوتیپی

Fig. 3. Dendrogram of cluster analysis for karyological characteristics using Ward method

گروه چهار قرار گرفتند که در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها از طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه‌تر برخوردار بودند و ژنوتیپ ۵۴۸ به تنهایی در گروه پنجم قرار گرفت.

در مطالعه‌ی غلامی و همکاران (Gholami *et al*., 2013) بر روی ژنوتیپ‌های چای ایران، تجزیه به مولفه‌های اصلی با کمک هشت خصوصیت از کروموزوم‌های میوزی مشخص نمود که ۹۹/۹۱ درصد از کل تغییرات با دو مولفه‌ی اول توجیه پذیرند. همچنین گروه‌بندی ژنوتیپ‌های موصوف با استفاده از ترسیم پلات دو بعدی و نیز تجزیه‌ی خوشه‌ای به روش UPGMA نشان داد که ارقام در سه کلاس جدا گروه‌بندی شدند.

با محاسبه‌ی خصوصیات ژنوتیپ‌های مورد آزمایش بر اساس شاخص‌های تجزیه به مولفه‌های اصلی (جدول ۵)، پلات دو بعدی ژنوتیپ‌های مورد بررسی برای دسته‌بندی آن‌ها ترسیم گردید (شکل ۴). این گروه‌بندی با دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس تجزیه‌ی خوشه‌ای تطابق دارد.



شکل ۴- نمودار دو بعدی پراکنش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای ۱۶ ژنوتیپ چای
Fig. 4. Two dimensional scatter diagram of principal component analysis for 16 tea genotypes

شناسایی تنوع ژنتیکی و دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مجزا، دو زمینه‌ی مطالعاتی وابسته به یکدیگرند که نتایج آن‌ها می‌تواند در اجرای صحیح برنامه‌های به‌نژادی کارگشا باشد. در دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ویژگی‌های کاریوتیپی، دورترین دسته‌های حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای، دارای بیشترین ناهماهنگی کروموزومی از نظر ساختار کروموزومی هستند (Mirzaie Nodoushan *et al*., 1999).

سپاسگزاری

نگارندگان بدین‌وسیله از ریاست محترم، معاونت محترم پژوهش و فناوری و همچنین همکاران پروژه تحقیقاتی پژوهشکده چای که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌کنند.

References

Agayev, Y. M. 1996. Advanced squash methods for investigation of plant chromosomes. Pp. 1-20. In: Proceedings of the 4th Iranian Congress on Crop Production and Breeding Sciences.

Ahmadishad, M. A. 2005. Genetic variation of Iranian tea clones using molecular markers of rapids. Ph.D. Thesis. Mazandaran University, Iran. 168 pp. (in Persian).

Ashoori, Z., Azadi, A. G., Uma, R. S. 2016. Study on karyotype of selected tea clones (*Camellia sinensis*) in Iran. Advances in Bioresearch 7 (2): 146-154.

Chaudhuari, T. C., 1992. Chromosomal complexes in tea (aneuploids and polyploids). Pp. 10-11. In: Proceedings of the national symposium on tea culture, processing and marketing. HLRF-UPASI, COONOR, India.

Ebrahim, F., Pakniyat, H., Arzani, A., and Ramimmalek, M. 2012. Karyotype analysis and new chromosome number reports in *Achillea* species. Biologica 67 (2): 284-288.

Ghanavati, F., Eskandari, H., Bakhshi Khaniki, G. 2011. Karylogical survey of some *Onobrychis* species. Crop Biotechnology 1: 85-95 (in Persian).

Gholami, M., Jamalomidi, M., Falakro, K. 2013. Karyological study of tea (*Camellia sinensis* L.) genotypes in Iran. Crop Biotechnology 4: 87-97.

Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Heredities 52: 201-220.

Mehrpour, S., Mirzaie Nodoushan, H., Majd, A., Sefidkon, F. 2002. Karyotypic studies of two Thymus Species. Cytologia 67 (4): 343-346.

Mirjani, L., Mirzaie Nodoushan, H., Ghamarizare, A., Bakhshi-Khaniki, Gh. 2005. Karyotypic investigations in several populations of *Festuca arundinacea*. Pajohesh and Sazandegi 65: 84-90 (in Persian)

Mirzaie Nodoushan, H., Dehghanshoar, M., Maddah-Arefi, H., Asadi-Corom, F. 2006. Karyotypic characteristics of several *Bromus* species. International Journal of Agriculture and Biology 8 (6): 717-720.

Nazari, Z., Mirzaie Nodoushan, H., Bakhshi-Khaniki ,Gh., Asadi-Corom, F. 2012. Karyotypic characteristics of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori in Iran. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 27 (4): 635-646 (in Persian).

Paszko, B. 2006. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. Plant System Evolution 258: 39-48.

Rahman, H., Khalil, I. H., Abbasi, F. M., Khanzada, Z. T., Shah, S. M. A., Shah, Z., Ahmad, H. 2010. Cytomorphological characterization of tea cultivars. Pakistan Journal of Botany 42 (1): 485-495.

Romero-Zarco, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon 35: 526-530.

Roy, S. C. 2006. Karyotype analysis in three cultivated varieties of tea (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) for their characterization. Journal of Phytological Research 19 (2): 203-207.

Sharma, S., Raina, S. N., Jain, N. K. 2006. Chromosome constitution of some Indian tea clones. International Journal of Tea Science 3: 201-214.

Sheidai, M. 2001. Cytogenetic. First edition. Adena Press. Tehran, Iran. 406 pp. (in Persian)

Sheidai, M., Jahanbakht, H., Soufi, S. P. 2004. Cytogenetic study of various types of tea (*Camellia sinensis*) cultivars in Iran. Iranian Journal of Science and Technology 28: 33-42.

Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold Publisher. London. 216 pp.

Wachira, F. N., Germano, D. E. N., Magambo, M. J. S. 1999. A comparative inter-specific karyotype analysis in some Kenya tea cultivars, *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze. Discovery and Innovation 11: 199-206.

Zuo, L., Yuan, Q. 2001. The difference between the heterogeneity of the centromeric index and intrachromosomal asymmetry. Plant Systematics and Evolution 297: 141-145.